植 物 分 类 与 资 源 学 报　2015, **37** (6): 821~827
Plant Diversity and Resources　DOI: 10.7677/ynzwyj201515046

促葡萄糖摄取细胞模型的构建及应用*

胡海军[1,3]，田维锋[1,3]，逯艳婷[1,3]，刘海洋[1]，胡　敬[1]，贡潘偏抽[1,3]，
王　芳[1,3]，张玉梅[2**]，熊文勇[1**]，孔清华[1**]

(1 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室，昆明　650201；
2 中国科学院西双版纳热带植物园，昆明　650223；3 中国科学院大学，北京　100049)

摘要：植物是发现先导药物的天然宝库，目前抗糖尿病药物的一个重要来源是植物。从植物中发现抗糖尿病药物的关键在于抗糖尿病药物筛选模型的建立。为获得一个更稳定、筛选结果更可靠的抗糖尿病药物筛选模型，本文对基于脂肪细胞摄取葡萄糖的药物筛选模型进行优化。文献报道的该类模型，只将胰岛素作为阳性对照，而本文同时将胰岛素和罗格列酮作为阳性对照，使模型更加稳定、筛选结果更加可靠。此外，本文还以胰岛素信号通路抑制剂 Akt1/2 抑制剂作为另一阳性对照，使之还可应用于胰岛素信号通路抑制剂的筛选，扩展了该模型的用途。最后，对 16 个植物来源的天然产物在该模型进行筛选，其结果稳定，并发现 3 个活性化合物。进一步对活性化合物 X15、X16 进行浓度梯度实验，结果表明，两者的活性都具有明显的浓度依赖性。X15 和 X16 的细胞增敏活性的研究为后续进一步研究其分子作用机理奠定基础，并为后期可能的药物开发提供分子候选。

关键词：3T3-L1 脂肪细胞；抗糖尿病药物筛选；细胞模型；葡萄糖摄取；天然产物

中图分类号：Q 946　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：2095-0845(2015)06-821-07

The Development and Application of the Glucose Uptake Stimulating Cell Model

HU Hai-jun[1,3], TIAN Wei-feng[1,3], LU Yan-ting[1,3], LIU Hai-yang[1], HU Jing[1],
GONGPAN Pian-chou[1,3], WANG Fang[1,3], ZHANG Yu-mei[2**],
XIONG Wen-yong[1**], KONG Qing-hua[1**]

(1 *State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 2 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650223, China; 3 *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: The plants are great resources for digging leading compounds, and many current anti-diabetic drugs are derived from plants. The key to discover compounds with anti-diabetic activities from plants relies on the application of anti-diabetic drug screening models. In order to establish a more stable and reliable anti-diabetic drug screening model, we optimized the screening model based on the glucose uptake of adipocytes. In the previous models, insulin was used as the only positive control, while in our model both insulin and rosiglitazone were used as positive controls, which made the model more stable and reliable. Furthermore, we expanded the application of the model to screen the insulin signaling pathway inhibitors, and Akt1/2 inhibitor which was an inhibitor of insulin signaling pathway was used as positive control. In the end, we screened 16 compounds isolated from plants using this model and identified three active compounds with glucose uptake stimulating activities. We also performed the dose-re-

* 基金项目：中国科学院（292013312D11004）；云南省科技厅（39Y33H521261，2014FA043）基金资助
** 通讯作者：Authors of correspondence; E-mail: xiong.wenyong@mail.kib.ac.cn; kongqinghua@mail.kib.ac.cn; zymei@xtbg.ac.cn
收稿日期：2015-03-16，2015-06-23 接受发表
作者简介：胡海军（1986-）男，硕士研究生，主要从事抗 II 型糖尿病药物筛选及机制研究。

sponse experiments of compound X15 and X16. Both showed significant dose-responses. These activities were first reported at the cell level, providing fundamental data for their mechanisms study of the activities and for the potential development of the drugs in future.

Key words: 3T3-L1 adipocytes; Anti-diabetic drug screening; Cell model; Glucose uptake; Natural products

糖尿病是一种以高血糖为特征的慢性代谢性疾病。糖尿病的持续高血糖与长期代谢紊乱等可导致全身组织器官，特别是眼、肾、心血管及神经系统的损害及其功能障碍和衰竭，严重危害健康（Vinik 和 Vinik，2003）。随着生活水平提高、人口老龄化以及肥胖发生率的增加，糖尿病发病率迅速升高并有年轻化趋势（Weill 等，2004）。国际糖尿病协会数据显示，2011 年全球糖尿病患者总数高达 3.66 亿，预计这一数字到 2030 年将达到 5.52 亿（Whiting 等，2011）。糖尿病患者中约有 90%~95%属于Ⅱ型糖尿病（Alberti 和 Zimmet，1998），它是由胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗（胰岛素相对缺乏）所致（Leney 和 Tavaré，2009）。因此Ⅱ型糖尿病是糖尿病研究的重点。目前临床应用最广泛的抗Ⅱ型糖尿病药物主要有磺脲类、双胍类、噻唑烷二酮类和 α-葡萄糖苷酶抑制剂等。这些药物取得了较好的疗效，都能使血液中葡萄糖浓度明显下降，但长期使用后都不能很好控制血糖浓度。此外，这些药物也有一定的副作用，如肝肾毒性、浮肿、腹泻等，因此在肝功能不全的患者中其应用受到一定限制，而且部分患者不能长期耐受其治疗（Cheng 和 Fantus，2005）。因此，新型降血糖药的开发一直是抗Ⅱ型糖尿病药物研究的重点。

抗Ⅱ型糖尿病药物有两种来源，一种是通过化学合成获得，另外一种是从天然产物中获得。通过化学合成来开发新型抗Ⅱ型糖尿病药物的成本很高、难度较大，而且所得到的药物毒性往往很大。而从天然产物中获得抗糖尿病药物具有成本低、难度小、药物毒性和副作用弱的优点。因此，从天然产物中筛选出更好的、高效低毒且作用机理清楚的抗糖尿病药一直是当前Ⅱ型糖尿病研究的热点。而抗糖尿病药物开发的关键在于建立高效、可靠、稳定的抗糖尿病药物筛选模型。通过测定细胞的葡萄糖摄取来判断化合物的降糖活性是一种比较经典的抗糖尿病药物筛选方法，已被广泛应用。但已有的该类模型存在筛选结果稳定性差、可靠性不足的缺点，因此本文对之前报道的基于葡萄糖摄取的抗糖尿病药物筛选模型（Xie，2005）进行了优化。在文献报道的模型中，只将胰岛素作为阳性对照，而本文同时将胰岛素和罗格列酮作为阳性对照，增加了模型的稳定性和筛选结果的可靠性。同时，本文还以胰岛素信号通路抑制剂 Akt1/2 作为阳性对照，使该模型还可应用于胰岛素信号通路抑制剂的筛选，从而扩展了该模型的用途。植物天然产物是新药发现的一个重要来源，当前使用的处方药中，有超过 25%来源于植物（Smith 和 Clinard，2014）。云南地区具有丰富的植物多样性，是发现先导药物的资源宝库。我们利用该构建好的模型对一批植物来源的天然产物进行降糖活性筛选，成功地发现了 3 个活性化合物，我们还对其中两个化合物的活性进行了初步研究，为后续开展分子作用机制、结构修饰和可能深入开发奠定基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

化合物主要由中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室提供，小部分由中国科学院西双版纳热带植物园张玉梅老师提供。所用到的材料包括：3T3-L1 脂肪细胞（ATCC）、DMEM 高糖和低糖培养基（Hyclone）、小牛血清（GIBCO）、胎牛血清（GIBCO）、青霉素/链霉素（BI）、胰蛋白酶（BI）、罗格列酮（SIGMA）、Akt1/2 抑制剂（SIGMA）、甲醛溶液（SIGMA）、异丙基甲基黄嘌呤（3-isobutyl-1-methylxanthine，IBMX）（SIGMA）、胰岛素（Roche）、地塞米松（Dexamethasone，DEX）（Adamas）、牛血清白蛋白（上海生工生物有限公司）、葡萄糖检测试剂盒（上海荣盛生物有限公司）。

1.2　细胞培养及分化

将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 10 cm 或 6 cm 细胞培养皿中，用含 10%新生牛血清和 1%青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养基在 37 ℃、10% CO_2 条件下培养，待细胞长满融合后饥饿 2 d，再加入含 0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IBMX、1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ DEX、170 $nmol \cdot L^{-1}$ 胰岛素、1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 罗格列酮、10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培

养基诱导分化 72 h，然后再换成含 170 nmol·L^{-1}胰岛素和 10%胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h，诱导分化 6~7 d 后，90%以上呈脂肪细胞表型，可用于后续实验（Frost 和 Lane，1985；Govers 等，2004）。

1.3　油红 O 染色

用磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline，PBS）清洗细胞 1 次，先加入 10%甲醛溶液在室温下固定 10 min，再换新鲜的 10%甲醛溶液在室温下继续固定 1 h。之后用蒸馏水清洗 1 次，再用 60%的异丙醇漂洗 1 次，并充分晾干。最后加入油红 O 溶液染色 10 min，蒸馏水清洗 2 次，观察并拍照。

1.4　胰岛素的葡萄糖消耗曲线

将分化好的 3T3-L1 脂肪细胞接种到 96 孔板，过夜培养，分别用终浓度为 0 nmol·L^{-1}、0.1 nmol·L^{-1}、0.5 nmol·L^{-1}、1 nmol·L^{-1}、10 nmol·L^{-1}、100 nmol·L^{-1}、200 nmol·L^{-1}的胰岛素处理 24 h，每个浓度设 3 个重复孔，然后取培养基 10 μL，用葡萄糖试剂盒检测培养液中的葡萄糖浓度，以未接种细胞的空白复孔的葡萄糖含量均值为初始值，算出各孔细胞的葡萄糖消耗量（Zhou 等，2007）。

计算公式为：

葡萄糖消耗量 $n = (C_{空白孔} - C_{给药孔}) * V$　　（1）

1.5　罗格列酮的葡萄糖消耗曲线

将分化好的 3T3-L1 脂肪细胞接种到 96 孔板，过夜培养，分别用含有 1 nmol·L^{-1}胰岛素和 0.1 nmol·L^{-1}、1 nmol·L^{-1}、10 nmol·L^{-1}、100 nmol·L^{-1}、1 000 nmol·L^{-1}、5 000 nmol·L^{-1}、10 000 nmol·L^{-1}罗格列酮的培养基处理脂肪细胞 24 h，每个浓度设 3 个重复孔，然后取培养基 10 μL，用葡萄糖试剂盒检测培养液中的葡萄糖浓度，以未接种细胞的空白复孔的葡萄糖含量均值为初始浓度，算出各孔细胞的葡萄糖消耗量。

葡萄糖消耗量计算公式同（1）

1.6　Akt1/2 抑制剂的葡萄糖消耗曲线

将分化好的 3T3-L1 脂肪细胞接种到 96 孔板，过夜培养，分别用含有 200 nmol·L^{-1}胰岛素和 0.001 μmol·L^{-1}、0.01 μmol·L^{-1}、0.1 μmol·L^{-1}、0.5 μmol·L^{-1}、1 μmol·L^{-1}、5 μmol·L^{-1}、10 μmol·L^{-1} Akt1/2 抑制剂的培养基处理分化好的 3T3-L1 脂肪细胞 24 h，每个浓度设 3 个重复孔，取培养基 10 μL，用葡萄糖试剂盒检测培养基中的葡萄糖浓度，以未接种细胞的空白复孔的葡萄糖含量均值为初始浓度，算出各孔细胞的葡萄糖消耗量。

葡萄糖消耗量计算公式同（1）

1.7　利用促葡萄糖摄取细胞模型筛选具有降糖活性的天然产物

将分化好的 3T3-L1 脂肪细胞接种到 96 孔板，过夜培养，分别用含有 0.1 nmol·L^{-1}胰岛素和终浓度为 10 μmol·L^{-1}或 10 μg·mL^{-1}的化合物的培养基处理分化好的 3T3-L1 脂肪细胞 24 h，每个样设 3 个重复孔，取培养基 10 μL，用葡萄糖试剂盒检测培养液中的葡萄糖浓度，以未接种细胞的空白复孔的葡萄糖含量均值为初始浓度值，算出各孔细胞的葡萄糖消耗量。

葡萄糖消耗量计算公式同（1）

活性化合物的葡萄糖消耗增加率 = $(n_{活性化合物} - n_{0.1\ nmol \cdot L^{-1} 胰岛素}) / n_{0.1\ nmol \cdot L^{-1} 胰岛素} \times 100\%$

1.8　统计学处理

数据之间的比较用成对 t 检验，$^{*}P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异。

2　结果

2.1　促葡萄糖摄取细胞模型的构建

2.1.1　*3T3-L1 脂肪细胞的诱导分化*　3T3-L1 脂肪细胞在诱导分化前是非脂肪细胞，细胞内无脂滴积累（图 1：C）。细胞经诱导分化 6 天后，细胞内出现脂滴，呈现脂肪细胞形态（图 1：B，D）。经油红 O 染色后在显微镜下可见细胞内聚集大量脂滴，呈桔红色。染色结果显示，约 90%以上的 3T3-L1 细胞被诱导分化成脂肪细胞，可用于后续葡萄糖摄取实验（图 1：D）。

2.1.2　*胰岛素，罗格列酮和 Akt1/2 抑制剂在促葡萄糖摄取细胞模型的建立、优化及功能扩展中的应用*　用不同浓度的胰岛素处理诱导分化后的 3T3-Ll 脂肪细胞，结果显示随着胰岛素浓度的升高，葡萄糖消耗量也相应增加，呈现剂量依赖关系，胰岛素在 10 nmol·L^{-1}浓度时，脂肪细胞的葡萄糖消耗量已经接近最大值（图 2：A）。上述结果说明在我们的模型中，细胞摄取葡萄糖的水平可以很好地对药物刺激做出响应，这与前述报道一致（Li 等，2009）。

罗格列酮是当前临床应用最为广泛的一种噻唑烷二酮类抗糖尿病药（Mayerson 等，2002），它是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（Peroxisome proliferators-activated receptors γ，PPARγ）的激动剂，可以改善肌肉和脂肪组织的胰岛素抵抗。用不同浓度的罗格列酮处理诱导分化后的 3T3-Ll 脂肪细胞，结果显示，罗格列酮可以促进细胞对葡萄糖的摄取，在 100 nmol·L^{-1}浓度时，它的活性最强（图 2：B，C）。将其用作药物筛选时的阳性对照，可增加该模型的稳定性和可靠性。

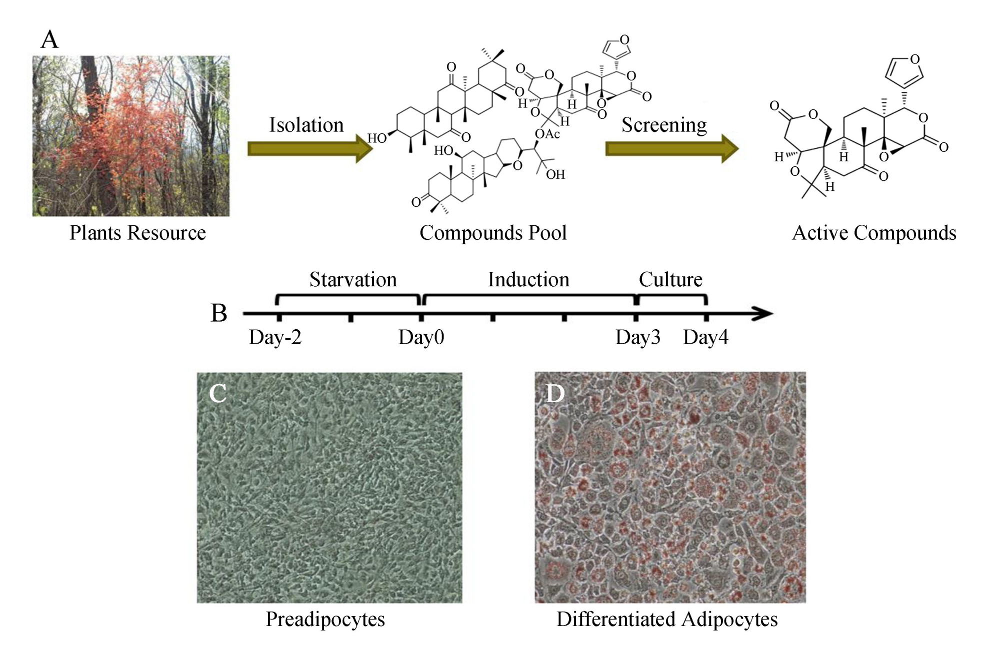


图 1 药物筛选及 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化流程。A，抗糖尿病药物筛选流程图；B，3T3-L1 脂肪细胞的分化过程；C，3T3-L1 前脂肪细胞在诱导分化前没有脂滴积累（20×）；D，诱导分化 6 天后，在细胞内有大量脂滴积累，可被油红 O 染成红色（20×）

Fig. 1 The procedures of drug screening and 3T3-L1 adipocytes differentiation. A, The procedure of screening active compounds from natural products. B, The differentiation procedure of 3T3-L1 adipocytes. C, There are no droplets in 3T3-L1 preadipocytes before differentiation (20×). D, After 6 days of induction by induction cocktails (see methods), the lipid droplets in adipocytes were appeared and stained by oil red O (20×)

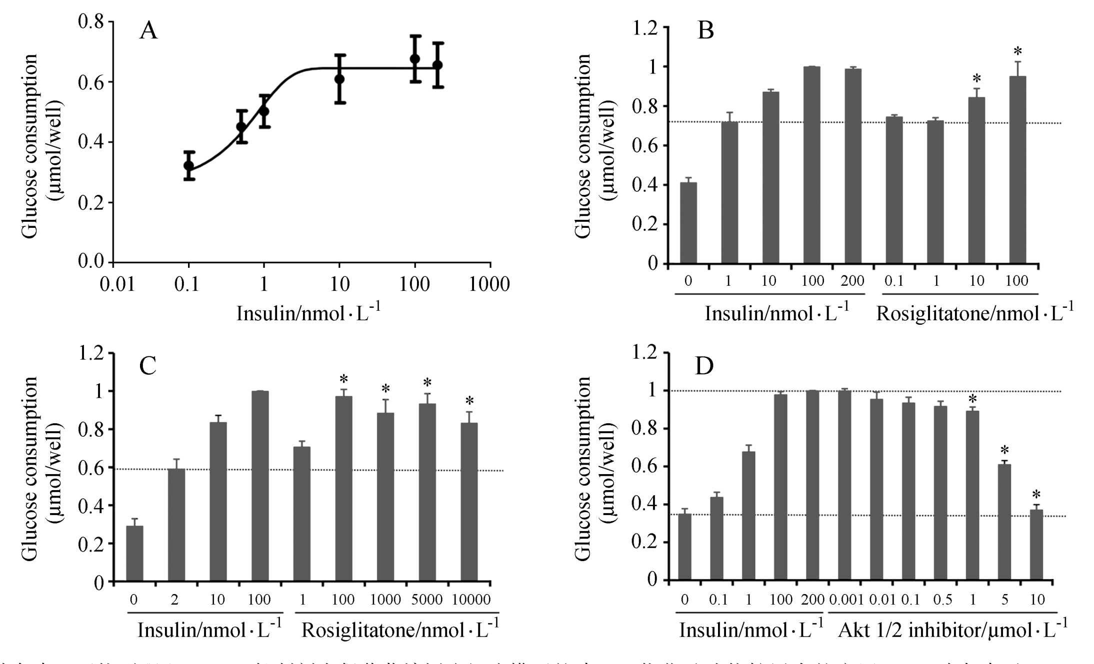


图 2 胰岛素、罗格列酮和 Akt1/2 抑制剂在促葡萄糖摄取细胞模型的建立、优化及功能扩展中的应用。A，胰岛素对 3T3-L1 脂肪细胞摄取葡萄糖的剂量效应关系；B，罗格列酮的浓度为 0.1～100 nmol·L^{-1}范围时对 3T3-L1 脂肪细胞摄取葡萄糖的影响；C，罗格列酮的浓度为 1 nmol·L^{-1}～10 μmol·L^{-1}范围时对 3T3-L1 脂肪细胞摄取葡萄糖的影响；D，Akt1/2 抑制剂对 3T3-L1 脂肪细胞摄取葡萄糖的剂量效应关系（n=3）

Fig. 2 The application of insulin, rosiglitazone and Akt1/2 inhibitor in construction, optimization and usage extension of glucose uptake stimulating cell model. A, The glucose uptake of 3T3-Ll adipocytes treated with different concentrations of insulin. B, The glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes treated with 0.1–100 nmol·L^{-1} rosiglitazone. C, The glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes treated with 1 nmol·L^{-1}–10 μmol·L^{-1} rosiglitazone. D, The glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes treated with different concentrations of Akt1/2 inhibitor (n=3)

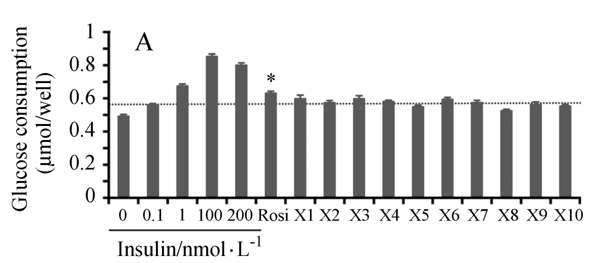
丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B（Protein Kinase B，PKB/Akt）是胰岛素信号通路中的关键蛋白，在胰岛素刺激下，它可以被磷酸化，进而促进葡萄糖转运载体 4（Glucose transporter 4，GLUT4）的上膜转运，增加细胞的葡萄糖摄取（Leto 和 Saltiel，2012）。因此 Akt1/2 抑制剂可以通过抑制胰岛素信号通路的信息传递，从而抑制细胞对葡萄糖的摄取。如图 2D 所示，200 nmol · L^{-1}的胰岛素可以显著促进细胞对葡萄糖的摄取，但当 Akt1/2 抑制剂与 200 nmol · L^{-1}胰岛素同时处理脂肪细胞时，胰岛素的这种促葡萄糖糖摄取作用可以被抑制。随着 Akt1/2 抑制剂浓度的增加，葡萄糖消耗量相应下降，呈现很好的剂量依赖关系。当 Akt1/2 抑制剂的浓度达到 10 μmol · L^{-1}时，可将 200 nmol · L^{-1}胰岛素的促葡萄糖吸收活性完全抑制，细胞的葡萄糖消耗量恢复到基线水平（图 2：D）。这说明该细胞模型的分子基础与先前报道的理论背景相一致，可扩展该模型用于筛选胰岛素信号通路抑制剂，Akt1/2 抑制剂可作为阳性对照。

2.2　应用促葡萄糖摄取细胞模型筛选具有降糖活性的天然产物

应用上述构建好的促葡萄糖摄取细胞模型有针对性地对 16 个从植物中提取的天然产物进行降糖活性筛选。结果显示，X11、X15、X16 三个化合物在 10 μg · mL^{-1}初筛浓度下显示出不同程度地促葡萄糖吸收活性，葡萄糖摄取量分别提高了 27.4%、49.7%和 13.9%（图 3：A，B）。活性化合物 X11 是 Alisol A 24-acetate，它提取自东方泽泻（*Alisma orientale*）（图 3：C）（Jin 等，2012）。活性化合物 X15 是从采自西双版纳的茜草科单种属植物黄棉木（*Metadina trichotoma*）提取的一种齐敦果酸型皂苷，其化学名为 pyrocincholic acid-3β-*O*-*β*-D-quinovopyranosyl-28-*O*-*β*-D-glucopyranoside（图 4：A）。而活性化合物 X16 则是从叶子花（*Bougainvillea spectabilis*）中提取的另一种齐敦果酸型皂苷，其化学名为 3-O-［*β*-D-xylopyranosyl（1→3）*β*-D-methylglucuronopyranoxylate］oleanolic acid（图 4：B）。

2.3　对筛选到的活性化合物进行浓度梯度实验

我们还进一步对活性化合物进行浓度梯度实验，以验证其活性是靶点专一性而非假阳性。由于活性化合物 X11 样品量少，不足以开展浓度梯度实验，并且其抗糖尿病活性已有文献报道（Li 和 Qu，2012），因此本文并未开展 X11 的浓度梯度实验，而只对活性化合物 X15 和 X16 进行了浓度梯度实验。结果表明，X15 在 0.1 μg · mL^{-1} ~ 10 μg · mL^{-1}浓度范围内具有很好的剂量依赖性，其最大活性浓度为 10 μg/mL，葡萄糖摄取水平可提高 40.1%（图 3：C）。而活性化合物 X16 在 0.001 μg · mL^{-1} ~ 1 μg · mL^{-1}浓度范围内也存在很好的剂量依赖性，最大活性浓度为 1 μg · mL^{-1}，葡萄糖摄取水平可提高 41.8%（图 3：D）。但随着 X16 浓度的进一步增加（10 或 20 μg · mL^{-1}），其活性反而下降，提示在高浓度下 X16 可能对细胞产生了其它影响，造成促葡萄糖吸收活性的下降。结果表明，该模型可以很好地筛选出具有降糖活性的植物天然产物，为进一步开发新型抗糖尿病药物提供基础。



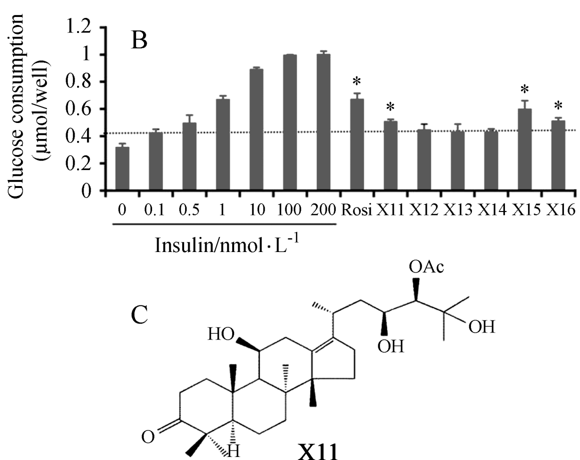


图 3　植物天然产物的筛选及活性化合物的早期发现。A 和 B，对 16 个植物来源的天然产物（浓度为 10 μmol · L^{-1}或 10 μg · mL^{-1}）在该细胞模型中进行活性筛选（* 表示活性化合物，$n = 3$）；C，化合物 X11 的化学结构

Fig. 3　The screening of the natural compounds from plants and identification of active compounds. A and B, Screening of 16 natural compounds using the glucose uptake stimulating cell model. (The concentrations of compounds are 10 μmol · L^{-1} or 10 μg · mL^{-1}, * represents the active compounds, $n = 3$). C, Chemical structure of compound X11

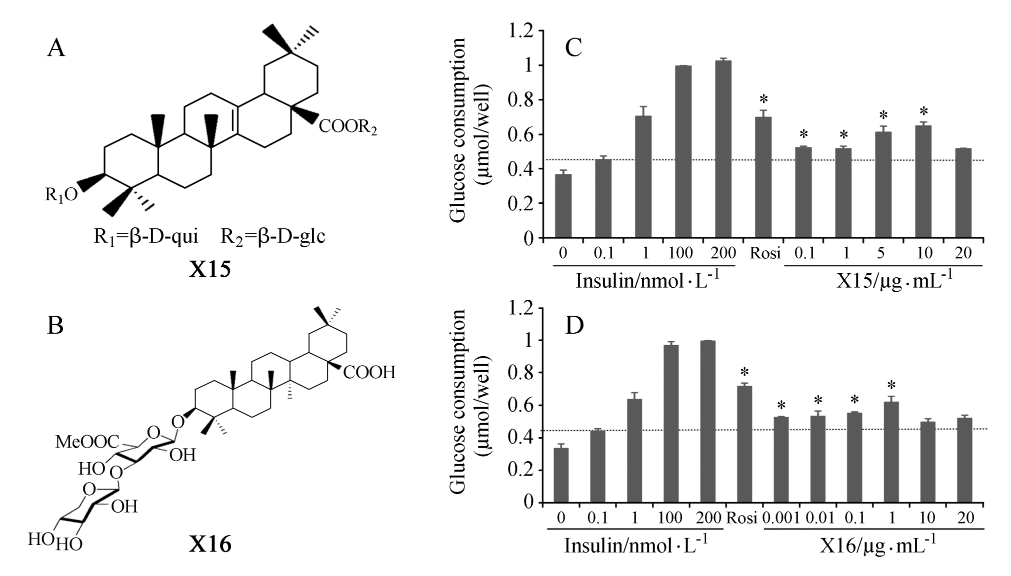


图4 活性化合物的化学结构和浓度梯度实验。A，活性化合物X15的化学结构；B，活性化合物X16的化学结构；C，活性化合物X15浓度梯度实验（n=3）；D，活性化合物X16浓度梯度实验（n=3）

Fig. 4 Chemical structures and dose-response experiments of active compounds. A, Chemical structure of compound X15. B, Chemical structure of compound X16. C, The glucose uptake of 3T3-L1 adipocyte cells treated with different concentrations of X15 (n=3). D, The glucose uptake of 3T3-L1 adipocyte cells treated with different concentrations of X16 (n=3)

3 讨论

随着糖尿病患者数量的逐年增加和用于治疗的巨额开支，糖尿病已成为备受人们关注的社会、经济和健康问题。目前，常用的抗糖尿病药主要有二甲双胍类、噻唑烷二酮类、硫脲类和非硫脲类等（Nathan等，2009）。由于目前临床上使用的抗糖尿病药都存在一定的局限性，因此，开发出新型的、更高效安全的抗糖尿病药将具有重要意义。通常，新型抗糖尿病药物的开发过程是从植物资源中分离出各种化合物，建立化合物库，然后利用各种抗糖尿病药物筛选模型从中筛选出活性化合物，再以这些活性化合物作为候选化合物，经过一系列修饰改造、药效评价和安全评价之后最终开发成新型抗糖尿病药（图1：A）。因此，新型抗糖尿病药物的研发依赖于各种抗糖尿病药物筛选模型的应用。

在本研究中，我们首先进行了促葡萄糖摄取细胞模型的构建。该模型的原理是基于化合物能否促进成熟3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖摄取，从而判断该化合物的降糖活性情况。3T3-L1脂肪细胞的培养是本研究的基础，本研究所用3T3-L1脂肪细胞的分化率均在95%以上（图1：B），完全能满足实验要求。为了检验细胞摄取葡萄糖的水平是否可以对药物刺激做出灵敏响应，我们用不同浓度的胰岛素处理3T3-L1脂肪细胞，然后检测其葡萄糖摄取量的差异。胰岛素是一种非常强的降血糖药物，它能通过促进GLTU4上膜来增加细胞对葡萄糖的摄取（Saltiel和Kahn，2001）。实验结果表明，在我们的体系中胰岛素可以显著地促进脂肪细胞的葡萄糖摄取，并且呈现很好的剂量依赖关系。在10 nmol·L^{-1}浓度下，3T3-Ll脂肪细胞的葡萄糖消耗量已经接近最大值，约为对照的3倍。因此，胰岛素可以作为筛选抗糖尿病药时的阳性对照，来判断待测化合物的活性情况。

罗格列酮是临床上广泛使用的一种非胰岛素抗糖尿病药，本模型用其作为另一阳性对照。罗格列酮主要是通过与转录因子PPARγ结合，激活PPARγ，进而调控一些糖代谢和脂代谢相关基因的表达（Spiegelman，1998）。本研究发现罗格列酮能显著地促进3T3-L1脂肪细胞摄取葡萄糖，并且在100 nmol·L^{-1}浓度下，其活性达到最大。因此本模型选择罗格列酮作为筛选抗糖尿病药物时的另一阳性对照。当罗格列酮正常工作时，说明模型工作正常，实验结果可靠。

我们的模型还可用于筛选胰岛素信号通路的抑制剂。200 nmol·L^{-1}胰岛素可以显著促进细胞摄取葡萄糖，通过检测化合物是否可以降低胰岛素的这种促进效果，可以筛选出胰岛素信号通路

抑制剂。我们用已知的 Akt1/2 抑制剂来抑制胰岛素信号通路，发现它能显著地降低 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取，并且呈现很好的剂量依赖关系，在 10 μmol·L^{-1}浓度下可将葡萄糖摄取量恢复到基线水平。

植物天然产物是新药发现的一个重要来源，其化学骨架具有多样性，并且在植物中行使不同的生物学功能。我们应用构建好的抗糖尿病药物筛选模型对 16 个植物来源的天然产物进行活性筛选。结果显示有 3 个化合物具有促进 3T3-L1 脂肪细胞摄取葡萄糖的活性，它们分别是 X11、X15 和 X16。这三个化合物中，X11 已在 3T3-L1 脂肪细胞中发现具有抗糖尿病活性（Li 和 Qu，2012），化合物 X15 的抗糖尿病活性是首次被发现，而 X16 之前只在体内报道过具有抗糖尿病活性，在细胞水平上属首次发现（Matsuda 等，1998）。综上所述，我们的模型可以非常有效地筛选出植物中具有降糖活性的化合物。今后，我们一方面将增加化合物数量、扩大筛选范围，以筛选出更多的活性化合物类型；另一方面将对活性非常好的化合物的作用机制进行深入研究并进行体内药效评价，从而为开发出更加安全、有效的抗糖尿病药提供基础。

致谢 感谢中国科学院西双版纳热带植物园张玉梅副研究员以及中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室刘海洋研究员提供的样品。

〔参 考 文 献〕

Alberti KG, Zimmet PZ, 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation [J]. *Diabetic Medicine*, **15**: 539—553

Cheng AY, Fantus IG, 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus [J]. *Canadian Medical Association Journal*, **172**: 213—226

Frost SC, Lane MD, 1985. Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **260**: 2646—2652

Govers R, Coster ACF, James DE, 2004. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway [J]. *Molecular and Cellular Biology*, **24**: 6456—6466

Jin HG, Jin Q, Kim AR *et al.*, 2012. A new triterpenoid from alisma orientale and their antibacterial effect [J]. *Archives of Pharmacal Research*, **35**: 1919—1926

Leney SE, Tavaré JM, 2009. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets [J]. *Journal of Endocrinology*, **203**: 1—18

Leto D, Saltiel AR, 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**: 383—396

Li JN (李晋南), Liu MY (刘铭瑶), Hou YT (侯玉婷) *et al.*, 2009. Human fibroblast growth factor 21regulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学学报), **25**: 556—562

Li Q, Qu H, 2012. Study on the hypoglycemic activities and metabolism of alcohol extract of alismatis rhizoma [J]. *Fitoterapia*, **83**: 1046—1053

Matsuda H, Li Y, Murakami T *et al.*, 1998. Antidiabetic principles of natural medicines. III. structure-related inhibitory activity and action mode of oleanolic acid glycosides on hypoglycemic activity [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **46**: 1399—1403

Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S *et al.*, 2002. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, **51**: 797—802

Nathan DM, Buse JB, Davidson MB *et al.*, 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy a consensus statement of the american diabetes association and the european association for the study of diabetes [J]. *Diabetes Care*, **32**: 193—203

Saltiel AR, Kahn CR, 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Nature*, **414**: 799—806

Smith JD, Clinard VB, 2014. Natural products for the management of type 2 diabetes mellitus and comorbid conditions [J]. *Journal of the American Pharmacists Association*, **54**: e304—e321

Spiegelman B, 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor [J]. *Diabetes*, **47**: 507—514

Vinik AI, Vinik E, 2003. Prevention of the complications of diabetes [J]. *American Journal of Managed Care*, **9**: S63—S80

Weill J, Vanderbecken S, Froguel P, 2004. Understanding the rising incidence of type 2 diabetes in adolescence [J]. *Archives of Disease in Childhood*, **89**: 502—504

Whiting DR, Guariguata L, Weil C *et al.*, 2011. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **94**: 311—321

Xie JQ (谢洁琼), 2005. The development and application of the methods of screening for the anti-diabetic drugs [D]. *Academy of Military Medical Sciences* (中国人民解放军军事医学科学院)

Zhou L, Yang Y, Wang X *et al.*, 2007. Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin [J]. *Metabolism*, **56**: 405—412